



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 41 19 574 A 1

51 Int. Cl. 5: **C07 H 21/04**  
C 12 P 19/34

DE 41 19 574 A 1

21 Aktenzeichen: P 41 19 574.4  
22 Anmeldetag: 14. 6. 91  
43 Offenlegungstag: 17. 12. 92

71 Anmelder:

Diagen Institut für molekularbiologische Diagnostik  
GmbH, 4000 Düsseldorf, DE

74 Vertreter:

von Kreisler, A., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.;  
Werner, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Fues, J.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Böckmann gen. Dallmeyer,  
G., Dipl.-Ing.; Hilleringmann, J., Dipl.-Ing.; Jönsson,  
H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Meyers, H., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

72 Erfinder:

Henco, Karsten, Dr.; Colpan, Metin, Dr., 4006  
Erkrath, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur Lagerung und/oder zum Transport von Nukleinsäuren

57 Es wird ein Verfahren zur Lagerung und/oder zum Transport von Nukleinsäuren in nicht gelöster Form beschrieben, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure an mineralische Feststoffe reversibel gebunden wird, vom Lösungsmittel befreit und im absorbierten Zustand gelagert und/oder transportiert wird. Die so behandelten Nukleinsäuren zeigen praktisch keine Veränderungen hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität.

DE 41 19 574 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Lagerung und/oder zum Transport von Nukleinsäuren in nicht gelöster Form, die Verwendung mineralischer Feststoffe zur Lagerung und/oder zum Transport von Nukleinsäuren sowie die Verwendung von mineralischen Feststoffen zur Herstellung eines Lagerungs- und/oder Transportmittels für Nukleinsäuren unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität.

Im Zuge der Entwicklung der Gentechnologie stellt sich in starkem Ausmaß das Problem, DNA- oder RNA-Moleküle mittel- und langfristig zu konservieren. Die biologische Aktivität sollte dabei ohne merkliche Einbußen erhalten bleiben. Es sind unterschiedliche Methoden bekannt (siehe Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989). So wurde beispielsweise rekombinante DNA in Form von Plasmiden in gefrorenen oder lyophilisierten Bakterienzellen gelagert. Freie DNA wird vornehmlich in lyophilisierter Form gelagert oder in Pufferlösungen in gefrorener Form. Für Plasmide ist es gewöhnlich hinreichend, sie in Form von Lyophilisaten zu lagern. Dabei werden Verluste der biologischen Aktivität, gemessen als Transfektionseffizienz susceptibler Zellen, dieser Lagerungsprodukte hingenommen.

Problematischer ist jedoch die Lagerung von nicht von sich aus replikationsfähigen DNA- oder RNA-Segmenten in lyophilisierter Form. Dies betrifft beispielsweise Restriktionsfragmente, die ihre Fähigkeit zur Ligation erhalten sollen oder Genomsegmente, wie sie im Rahmen nationaler oder internationaler Forschungskordinationen zwischen den gentechnischen Laboratorien ausgetauscht werden. Als zuverlässige Methode hat sich zwar die Lagerung und der Transport im gefrorenen Zustand bewährt. Dies bedeutet jedoch einen großen technischen wie auch wirtschaftlichen Aufwand. So muß zum Beispiel bei der Versendung von Nukleinsäuren in gefrorener Lösung jeweils Trockeneis mit hinzugegeben werden, um ein Auftauen der Probe, insbesondere bei längeren Transportwegen, zu vermeiden. Die Lagerung ist insofern nicht unproblematisch, als daß die Tiefgefrierereinheiten, die üblicherweise mit flüssigem Stickstoff betrieben werden, spezifische Absicherungen wie Alarmanlagen benötigen, um bei einem eventuellen Störfall hinreichend schnell Gegenmaßnahmen einleiten zu können. Es wird auch die unabhängige Doppellagerung bestimmter Proben durchgeführt, um Verluste unwiederbringlichen Materials zu vermeiden.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem ist somit die Bereitstellung eines Lagerungs- und Transportverfahrens für Nukleinsäuren, das die Nachteile des Standes der Technik vermeidet. Insbesondere soll das Verfahren auf Kühlung der zu lagernden Probe verzichten können und auch bei erhöhten Temperaturen bis zu 70°C ein Verlust der entsprechenden Nukleinsäure hinsichtlich ihrer Aktivität vermeiden.

Das technische Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch Adsorption der Nukleinsäuren an mineralischen Feststoffen und Lagerung und Transport der Nukleinsäuren in dieser Form, nach der Elution die Aktivität der so behandelten Nukleinsäuren praktisch unverändert ge-

blieben ist. Hingegen zeigten sich Ionenaustauschermaterialien und Adsorptionsmedien auf Basis von Cellulose als nicht geeignet, Nukleinsäuren unter Erhalt der biologischen Aktivität zu lagern und/oder zu transportieren.

Geeignete mineralische Feststoffe sind poröse oder nicht poröse Silicagele und/oder Gläser. Sie weisen vorzugsweise eine hohe Oberflächenbindungskapazität für die Nukleinsäuren auf. Typischerweise beträgt die Partikelgröße 0,1 µm bis 1000 µm. Das mineralische Feststoffmaterial liegt vorzugsweise in Partikel-, Platten-, Stäbchen-, Membran- oder Filterform vor.

Eine bevorzugte Verfahrensweise zum Aufbringen der Nukleinsäure auf die mineralischen Feststoffe erfolgt in an sich bekannter Weise dadurch, daß die zu behandelnden Nukleinsäuren aus wäßrigen Lösungen hoher Salzkonzentration auf dem mineralischen Feststoff gebunden werden. Dieser Effekt wird bereits benutzt zur Reinigung von Nukleinsäuren. Die Adsorption der Nukleinsäuren aus wäßrigen Lösungen erfolgt beispielsweise aus Lösungen, die 5 M NaCl enthalten oder anderen wäßrigen Lösungen mit ähnlichen Ionenstärken, zum Beispiel 3 M NaI, 4 M NaClO<sub>4</sub>, pH 7,0). Es ist ebenfalls bekannt, die Nukleinsäuren bei Bedarf mit reinem Wasser oder mit einem Puffer niedriger Ionenstärke, zum Beispiel TE 10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, zu eluieren.

Es kann vorteilhaft sein, die adsorbierte Nukleinsäure, nachdem sie vom Lösungsmittel befreit worden ist, zu lyophilisieren oder beispielsweise mit Alkohol zu überschichten. Bei dieser Behandlungsart bleibt die biologische Aktivität ebenfalls praktisch unverändert. Selbst wenn die flüchtigen Komponenten wie Ethanol und Restwasser verdampft sind, läßt sich die Nukleinsäure intakt zurückgewinnen. Dies ist insbesondere deshalb erstaunlich, da lyophilisierte freie Nukleinsäure bei Lagerung bei Zimmertemperatur eine Verringerung der Ligationseffizienz um den Faktor 10 zeigt. Dagegen ist bei der erfindungsgemäß gelagerten Nukleinsäure die Ligationseffizienz mit einer Aktivität von > 90% erhalten geblieben. Selbst die Lagerung bei 60°C für 5 Tage kann die Effizienz nicht wesentlich beeinflussen.

Es ist auch möglich, die Nukleinsäure, ohne daß sie von dem Lösungsmittel befreit wurde, im an den Feststoff adsorbierten Zustand zu lagern oder zu transportieren.

Mineralische Feststoffe der genannten Art sind somit geeignet, als Lagerungs- und Transportmittel für Nukleinsäuren zu dienen. Des weiteren sind die mineralischen Feststoffe geeignet zur Herstellung eines Lagerungs- und/oder Transportmittels von Nukleinsäuren unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird somit die Möglichkeit einer Lagerung und eines Transports von sensiblen biologisch aktiven Substanzen in kostengünstiger und technisch einfacher Weise bereitgestellt.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Lagerung und/oder zum Transport von Nukleinsäuren in nicht gelöster Form, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure an mineralische Feststoffe reversibel gebunden wird und im adsorbierten Zustand gelagert und/oder transportiert wird.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die mineralischen Feststoffe poröse oder nicht poröse Silicagele und oder Gläser sind.

3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die mineralischen Feststoffe poröse Träger mit hoher Bindungskapazität für Nukleinsäuren an der Oberfläche sind.

5

4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelgröße der mineralischen Feststoffe 0,1 bis 1000 µm beträgt.

5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die mineralischen Feststoffe in Partikel-, Platten-, Stäbchen-, Membran- oder Filterform vorliegen.

10

6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren unter Pufferbedingungen hoher Ionenstärke an die mineralischen Feststoffe gebunden werden und unter Bedingungen niedriger Ionenstärke vom mineralischen Feststoff eluiert werden.

15

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Hochsalzpufferbedingungen einer Lösung von etwa 5 M Kochsalz neben anderen Substanzen, wie Puffersalzen, und die Bedingungen niedriger Ionenstärke einer Lösung von weniger als 100 mM Natriumchlorid neben anderen Substanzen, wie Puffersalzen, entsprechen.

20

25

8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die am mineralischen Feststoff adsorbierte Nukleinsäure in getrockneter Form oder als Suspension mit organischem Lösungsmittel, vorzugsweise Ethanol, gelagert und/oder versandt wird.

30

9. Verwendung mineralischer Feststoffe zur Lagerung und/oder zum Transport von Nukleinsäuren, ohne deren biologische Aktivität zu verlieren.

35

10. Verwendung mineralischer Feststoffe zur Herstellung eines Lagerungs- und/oder Transportmittels für Nukleinsäuren unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität.

40

45

50

55

60

65

